

糖尿病ラットにおけるコーヒー生豆・大豆および 米糠混合醗酵抽出物の抗酸化効果

辻原 命子・木村 彰彦*・高田 敦士*・森松 千春*・大澤 俊彦**

Effects of Dietary Fermented Coffee Fresh Bean, Soybean and Bran Mixture Extracts on Oxidative Stress in Diabetic Rats

Nobuko TSUJIHARA, Akihiko KIMURA*, Atsushi TAKADA*,
Chiharu MORIMATSU* and Toshihiko OSAWA**

Abstract

The purpose of the present study was to investigate the elimination of active oxygen or free radicals by FFBBE. Male Wistar strain rats aged six weeks were used in this study. Rats were injected with streptozotocin as an oxidative stress agent to prepare a serious insulin deficiency diabetes model rat, and allocated to the control group (W-CRL) and other 2 groups (STZ-treated group : W-STZ, W-STZ given FFBBE group : W-STZ-FFBBE). Triglyceride levels in the serum decreased significantly in the diabetic rats given FFBBE (W-STZ-FFBBE) as compared with that in the diabetic rats (W-STZ), and decreased to the same levels as those of the control group (W-CRL). TBARS levels in the serum reduced significantly in the W-STZ-FFBBE as compared with that in the W-CRL. TBARS levels in the liver of the W-STZ increased significantly as compared with those of the W-CRL, but decreased significantly in the W-STZ-FFBBE. TBARS levels in the kidneys decreased significantly in the W-STZ-FFBBE as compared with those of the other 2 groups. GST and GSHPx activities in the liver and kidneys were elevated significantly in the W-STZ and W-STZ-FFBBE compared with the W-CRL group. These results suggest that FFBBE prevent oxidizing damage by the induction of diabetes.

緒 言

糖尿病は、持続的長期インスリン不足による脂質代謝異常、腎不全や網膜症などいわゆる糖尿病合併症を招きこれらの疾病は、フリーラジカル、活性酸素、過酸化脂質などの酸化ストレスが関与して生体傷害を起こしている。また持続する高血糖状態の結果として、種々のたんぱく質による糖化反応が亢進し、動脈硬化との関連についての報告^{1, 2)}もある。このような生体の酸化傷害を防御するには、抗酸化物質を含む食品を日常的に摂取することが望ましいと考えられる。天然の抗酸化性物質を多く含む食品として、米や米種子中のポリフェノール、黒米や赤米中の抗酸化性色素³⁾、大豆発酵食品^{4 ~ 9)}など数多く見い出されている。そこで本研究では、強力な活性酸素対応作用(SOD様作用)すなわち他の抗酸化剤であるビタミンCおよびカテキン類とは異なり、それ自身の抗酸化作用とともに体内のSOD活性を誘導する作用を有し、活性酸素消去能力とヒドロキシラジカル消去活性および過酸化脂質抑制効果のあることが示唆された米胚芽・大豆発酵抽出物(特許 185507)を原料としたコーヒー生豆特殊精製エキスと大豆および米糠混合醗酵抽出物(Fermented coffee fresh bean, soybean and bran mixture

* 東洋発酵株式会社

** 名古屋大学大学院生命農学研究科

extracts 以下FFBBEと略す)を用い、酸化ストレスによる脂質代謝系の改善効果を中心に検討することを目的とした。

本実験においては、フリーズドライ(FD)されたFFBBEをストレプトゾトシン(STZ)により誘発された糖尿病(インスリン依存型糖尿病)モデルラットに経口的に投与し、血清脂質組成への影響や酸化傷害から生成するチオバルビツール酸(TBA)反応陽性物質ならびにDNA酸化傷害物8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の生成に対する抑制効果を調べた。さらに酸化ストレスに対する生体内応答酵素系であるグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST; EC2.5.1.18)やグルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx; EC1.11.1.9)活性、およびSOD(EC1.15.1.1)活性の変動について測定し、新知見を得たので報告する。

実験方法

1. 糖尿病ラットの作成

ラットへの酸化ストレス剤として糖尿病誘発剤ストレプトゾトシン(STZ)を用いた。STZ(シグマ社製)は6 mg / 100 μ L/100gとなるように0.9%生理食塩水に溶解して腹腔内投与した。24時間以内に急激な低血糖に陥る可能性があるため、10%のグルコース溶液を飲水として投与した。また対照群ラットには、0.9%生理食塩水100 μ L/100gを腹腔内投与した。

2. 実験試料

コーヒー生豆・大豆および米糠混合醗酵抽出物(FFBBE)は、コーヒーの生豆(*Coffea arabica* L. Red cherry)をセラミックの刃で粉碎しpH5.5に調整した水溶液にて浸出した抽出物を作成した。これに厳選した米糠と大豆を混合して水を加えた後 pH9.0に調整し、納豆菌(*Bacillus subtilis* natto)を用いて、攪拌と通気を行いながら18時間醗酵させた。醗酵終了後、加熱処理を行い残った納豆菌を死滅させ圧搾機を用いて固形物を除去した後、得られた醗酵液を限外ろ過し、分子量5,000以上のものを除去した。さらに活性炭で脱色・脱臭を行った後、仕上げに5.0 μ 、0.45 μ の精密ろ過を行って醗酵液を得た。この醗酵液を凍結乾燥(FD)させ、実験試料とした。

3. 実験動物の飼育条件

6週齢(体重160~180 g)のWistar系雄ラット(日本エスエルシー(株)、浜松市)を用いた。Wistarラットは対照群(W-CRL)と他2群(STZ処理群:W-STZ, STZ処理・FFBBE投与群:W-STZ-FFBBE)に分けた。飼料は日本クレア(株)製の粉末飼料CE-2を基本飼料としSTZ-FFBBEには、FFBBE(FD)3.6mg / 匹 / 日を粉末飼料CE-2に添加し、ミキサー(KENMIX-Major)を用いて混合した後投与した。飼育は各群ステンレス製の個別ケージを用い、実験環境にならすため購入後1週間予備飼育した後、STZ処理を行い、糖尿病の発現後試験食の投与を開始した。飼育期間中は、週1回体重を測定し飼料摂取量は毎日の投与量より残存量を差し引いて算出した。飲水は自由摂取とした。また飼育最終週(飼育4週目)にラットを1匹ずつ代謝ケージに移し、24時間の尿を採取した。飼育室は室温23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 相対湿度55 \pm 5%, 1日12時間採光下(7:00a.m.~7:00p.m.明所)の条件とし、4週間(28日)飼育した。

4. 臓器の摘出と血清分離

ラットは飼育終了後、10時間絶食させ、軽いエーテル麻酔を施した後、解剖、採血し、肝臓および腎臓を摘出して湿重量を測定した。組織は還流した後、生理食塩水で洗浄し、-80 $^{\circ}$ Cの

フリーザー (SANYO MDF-192) に保存した。血液は採血後, 30分間室温に静置した後 3000r.p.m. で10分間遠心分離 (KUBOTA KC-70) を行い, 上清を -80℃ で保存し血清サンプルとした。

5. 粗酵素液の調製

凍結保存しておいた臓器 (肝臓および腎臓) を 3 mM-トリス塩酸バッファ (3 mM-Tris, 0.25M-ショ糖, 0.1mM-EDTA pH7.4) を用いて10%ホモジネートとした。ホモジネートは冷却遠心分離機 (KUBOTA 7930) を用い, 5000r.p.m. 4℃ で5分間遠心分離した後, 上清を適宜希釈し, 酵素溶液として使用した。

6. 血清成分の分析

血糖は和光純薬工業 (株) のキット試薬, グルコースC テストワコー (ムタロターゼ・GOD法) を使用した。総コレステロール (T-cho) は, 和光純薬工業 (株) のキット試薬, 総コレステロールEテストワコー (コレステロールオキシダーゼ・DAOS法) を用いた。トリグリセリド (TG) は日本商事 (株) のネスコートTGキット-GN (L-グリセロール 3-リン酸オキシダーゼ・酵素法) を用いた。チオバルビツール酸 (TBA) 反応陽性物質 (TBARS) は, 内藤ら¹⁰⁾ の方法により求めた。

7. 尿中成分の測定

尿糖は和光純薬工業 (株) のキット試薬, グルコースC テストワコー (ムタロターゼ・GOD法) を用いた。DNAの酸化傷害指標として用いられる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) 量は, 8-OHdG測定用キット (日本老化制御研究所製) を用いた。

8. 酵素活性の測定

グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) は, 種々の薬剤のグルタチオン抱合反応を触媒し, 肝臓の解毒代謝に関与する主要酵素の一つである¹¹⁾。活性測定は 1-クロロ-2, 4ジニトロベンゼン (CDNB) 法¹²⁾ を用いた。

グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) は, グルタチオン (GSH) を水素供与体とし, 過酸化水素または有機ヒドロペルオキシドを基質としてGSHペルオキシダーゼ反応を行わせ, このとき生成される酸化型グルタチオン (GSSG) を酵母のGSSGレダクターゼによりGSHに還元させる。このとき消費されるNADPHの減少を340nmでの吸光度の経時的減少として分光光度計により測定した¹³⁾。SOD活性は, キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系でチトクロームC法¹⁴⁾ を用いた。

9. チオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARS) の測定

TBARSは, 前述の組織酵素溶液の調製方法に基づき調製した試料溶液を用い, 内藤ら¹⁰⁾ の方法により測定した。

10. 統計処理

得られたデータは分散分析を行い, F値が有意 ($p < 0.05$) である場合には, Duncanのmultiple range testを用いて各群の平均間の有意差 ($p < 0.05$) 検定をおこなった。

結果および考察

1. 平均体重および平均飼料摂取量

平均体重 (A) および平均飼料摂取量 (B) を Fig. 1 に示した。糖尿病ラット (W-STZ) の体重増加は、対照群 (W-CRL) に比べて低かったが、FFBBE添加糖尿病ラット (W-STZ-FFBBE) は対照群 (W-CRL) とほとんど差がみられなかった。糖尿病ラット (W-STZ) およびFFBBE添加糖尿病ラット (W-STZ-FFBBE) の平均飼料摂取量は、対照群 (W-CRL) に比べて増加の傾向を示し、有意差はなかったが糖尿病に特徴的な症状の一つである多食症状の発現が認められた。

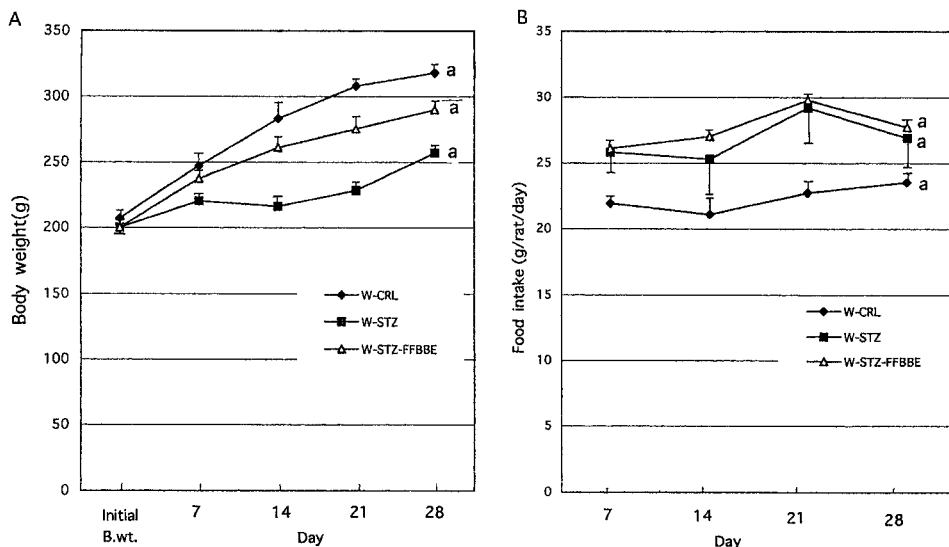


Fig. 1 Effect of dietary FFBBE on body weight (A) and food intake (B) of diabetic rats. Values are mean \pm SEM of five rats per group. Values within each line that do not share a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

2. 血清グルコースおよび尿中グルコース量の変化

血清グルコース (A) および尿中グルコース排泄量 (B) は、Fig. 2 に示した。STZ投与による膵 β -細胞の破壊に基づくインスリンの絶対不足により糖代謝が著しく乱れ対照群 (W-CRL) に比べて糖尿病ラット (W-STZ) およびFFBBE添加糖尿病ラット (W-STZ-FFBBE) で高血糖となった。対照群 (W-CRL) の血糖値が正常ラットにもかかわらず高値を示したのは、エーテル麻酔によるものと思われるが、高くなった値を差し引いても対照群 (W-STZ) より糖尿病群 (W-STZおよびW-STZ-FFBBE) で十分高血糖であったことから差はあったと思われる。しかし、FFBBE添加による低下効果は認められなかった。

また尿中グルコース排泄量も血清グルコースと同様に、対照群 (W-CRL) に比べて糖尿病ラット (W-STZ) とFFBBE添加糖尿病ラット (W-STZ-FFBBE) で高値を示した。これは尿細管における糖再吸収がいき値を超え、尿糖の排泄が起こり、これに伴って多尿を来した結果と考えられる。対照群 (W-CRL) で尿糖が検出されたがこれはラットの個体差によるものと思われる。

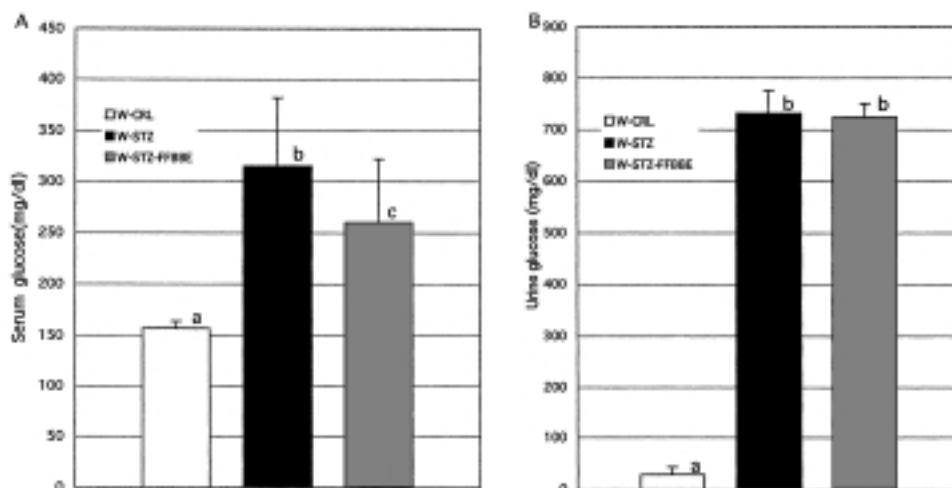


Fig. 2 Effect of dietary FFBFE on glucose level in serum (A) and urin (B) of diabetic rats. Values are mean \pm SEM of five rats per group. Values within each panel that do not share a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

3. 血清脂質成分の変化

糖尿病を発症するとインスリンの絶対的不足によって糖代謝をはじめ脂肪の代謝も著しく乱れ高脂血症を合併する。これはインスリン不足が持続することによりリポ蛋白リパーゼ活性が低下するためであると考えられている¹⁵⁾。Makら¹⁶⁾はSTZ投与による糖尿病ラットの血清TGおよび血清T-cholの著しい上昇について報告していることから本実験でも血清の脂質成分の変化について測定した。血清T-chol (A) および血清TG (B) はFig. 3に示した。血清総コレステロールは対照群 (W-CRL) に比べて糖尿病ラット (W-STZ) で著しく高くなったが、FFBFE添加 (W-STZ-FFBFE) により対照群 (W-CRL) のレベルまで低下した。血清T-cholが糖尿病ラット

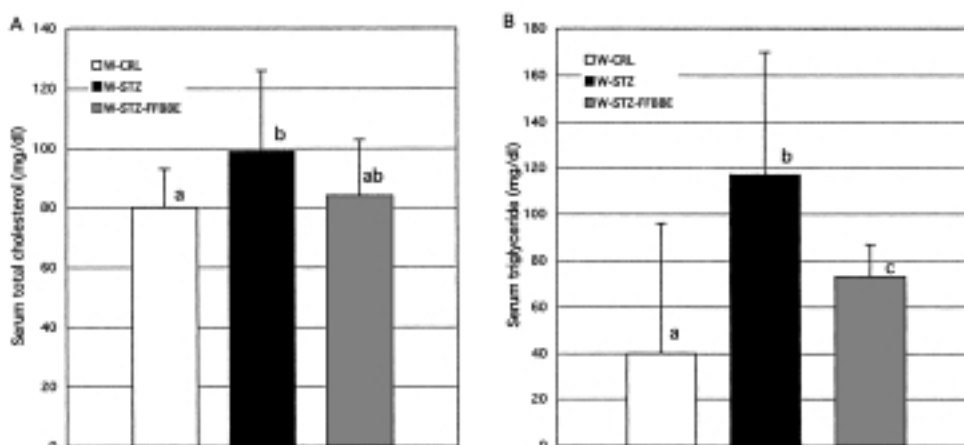


Fig. 3 Effect of dietary FFBFE on total cholesterol (T-chol)(A) and triglyceride (TG) (B) levels in serum of diabetic rats. Values are mean \pm SEM of five rats per group. Values within each panel that do not share a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

(W-STZ)で高値を示したのは、高TG血症と同時に低HDLコレステロール血症を合併し、軽度の高コレステロール血症を発現したものと思われる。そしてFFBBEを添加することによりコレステロールのキャリアーであるLDLの代謝に関与してT-choが低下したものと考えられる。また血清TGは対照群(W-CRL)に比べて糖尿病ラット(W-STZ)での増加が顕著であったがFFBBE添加(W-STZ-FFBBE)により有意($p<0.05$)に低下し、Makら¹⁶⁾の報告と一致した。TGの増加は動脈硬化促進の起因となるが、FFBBE添加による血清TGの有意($p<0.05$)な減少から、高TG血症を改善する可能性が考えられ、動脈硬化のなかでもとくに粥状動脈硬化の予防に期待できるものと推察した。さらに血清TBARS値は糖尿病ラット(W-STZ)が対照群(W-CRL)より有意($p<0.05$)に高値を示した。これはKakkarら¹⁷⁾の報告にもあるように、STZ投与による糖尿病発症で血清中のマロンジアルデヒド(MDA)が増加したことに起因すると考えられる。FFBBE添加(W-STZ-FFBBE)により対照群(W-CRL)と同じレベルにまで減少したことから、生体膜で生じた種々の脂質過酸化分解物の生成抑制あるいは消去にFFBBEが効果を示したと推察した。

4. 肝および腎組織のチオバルビツール酸反応陽性物質(TBARS)の変化

肝組織(A)および腎組織(B)におけるTBARSの測定結果はTable 1に示した。糖尿病ラット(W-STZ)の肝組織TBARSは対照群(W-CRL)に比べて有意($p<0.05$)に増加し、FFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)では有意($p<0.05$)に減少し

Table 1 Effect of dietary FFBBE on serum, liver and kidney thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of diabetic rats.

	Rat groups		
	W-CRL	W-STZ	W-FFBBE
In serum (nmol/mg protein)	0.09 ± 0.01 a	0.14 ± 0.04 b	0.08 ± 0.01 a
In liver (nmol/mg protein)	0.41 ± 0.04 a	0.61 ± 0.12 b	0.37 ± 0.12 a
In kidney (nmol/mg protein)	0.76 ± 0.03 a	0.81 ± 0.09 a	0.51 ± 0.03 b

Values are mean ± SEM of five rats per group.

Values within each column that do not share a common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

て、対照群(W-CRL)のレベルまで低下した。また、腎組織のTBARSも肝組織と同様にFFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)が群間で最も低くなったので、FFBBE添加による脂質過酸化の抑制がうかがえる。糖尿病の場合、高血糖による糖化反応の亢進などによって、活性酸素、 H_2O_2 や $\cdot OH$ が増加し、血漿中や組織の過酸化脂質が増加する。FFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)の肝および腎組織におけるTBARSの減少は、血清TBARSと同様に、酸化的ストレスで生じた活性酸素による脂質過酸化物の消去にFFBBEがその効果を発揮したものと思われる。

5. 尿中8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の変化

生体内で生じた活性酸素によるDNA中の核酸塩基デオキシグアノシンに対する攻撃の結果、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)が生成する。そこで細胞内におけるDNAの酸化傷害の程度を知る指標として尿中8-OHdG量の測定を行った。飼育最終週(第4週目)に採取した尿24時間あたりの8-OHdG量(ng)はFig. 4に示した。尿中8-OHdG量は対照群(W-CRL)に比べて糖尿病ラット(W-STZ)で有意($p<0.05$)に増加し、FFBBEによる添加効果はみられなかった。

糖尿病誘発によるDNAの酸化傷害に対してFFBBE (FD) が抗酸化効果を示す傾向にあることも考えられるが、今回の測定では明確な結果は得られなかった。

6. 肝および腎組織における抗酸化酵素活性の変化

6.1 グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) 活性

抗酸化酵素活性の測定結果はTable 2 に示した。

グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) はグルタチオンへの基質依存性は高いが、ヒドロペルオキシド (ROOH) に関しては特異性がほとんどなく、過酸化水素 (H_2O_2) その他多くのこれらの過酸化物を還元し、このとき還元型グルタチオン (GSH) が酸化されて酸化型グルタチオン (GSSG) を生じる。生体内ではこのGSSGはグルタチオン (GSSG) レダクターゼにより還元されGSHを再生する¹⁹⁾。肝組織におけるグルタチンペルオキシダーゼ (GSHPx) 活性は対照群 (W-CRL) に比べて糖尿病ラットで減少傾向を示し、FFBBE添加糖尿病ラット (W-STZ-FFBBE) が有意 ($p<0.05$)

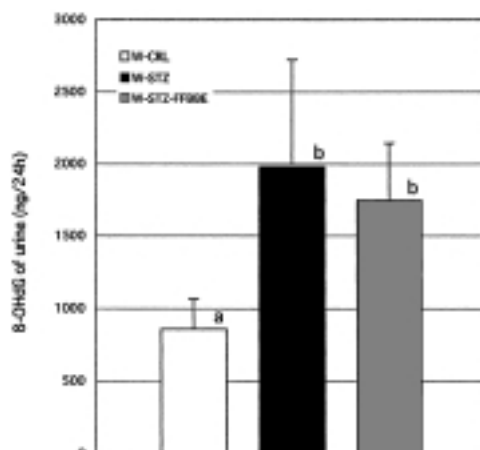


Fig. 4 Effect of dietary FFBBE on 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG) in urine (26day) of diabetic rats. Values are mean \pm SEM of five rats per group. Values within each panel that do not share a common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

Table 2 Effect of dietary FFBBE on antioxidative enzyme of diabetic rats.

	Rat groups		
	W-CRL	W-STZ	W-FFBBE
In liver			
GSHPx activity (U/mg protein)	99.4 \pm 12.2 a	90.7 \pm 7.01 a	133.4 \pm 7.42 b
GST activity (U/mg protein)	0.41 \pm 0.05 a	0.52 \pm 0.11 b	0.49 \pm 0.12 a, b
SOD activity (U/mg protein)	0.66 \pm 0.43 a	2.38 \pm 0.23 a	2.55 \pm 0.35 a
In kidney			
GSHPx activity (U/mg protein)	90.6 \pm 18.1 a	93.1 \pm 18.7 a	122.5 \pm 11.4 b
GST activity (U/mg protein)	0.15 \pm 1.14 a	0.42 \pm 0.11 b	0.43 \pm 0.06 b
SOD activity (U/mg protein)	1.81 \pm 0.45 a	2.43 \pm 0.55 a	2.91 \pm 0.43 a

Values are mean \pm SEM of five rats per group.

Values within each column that do not share a common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

に増加した。また、腎組織のGSHPx活性も糖尿病ラット(W-STZ)に比べてFFBBEを添加した糖尿病ラットで有意($p<0.05$)に増加した。これはSTZ投与により細胞内に生成した過酸化物を消去するために利用されたグルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)が増加したものと考えられ、FFBBE添加(W-STZ-FFBBE)による肝および腎組織のTBARS値の有意($p<0.05$)な減少からも理解できる。またFFBBEを添加したことでさらに酸化抑制効果が増加したものと思われる。

6.2 グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)活性

肝組織のGST活性値は糖尿病ラット(W-STZ)とFFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)が対照群(W-CRL)より有意($p<0.05$)に増加したが、FFBBE添加の効果はみられなかった。腎組織では対照群(W-CRL)に比べて糖尿病ラット(W-STZ)およびFFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)が有意($p<0.05$)に高値を示した。GSTは動物組織に広く分布し、肝の解毒代謝に関与する主酵素のひとつであるが、STZ処理による酸化ストレスに対する解毒効果は肝組織よりも腎組織において亢進したものと考えられる。

6.3 スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性

持続する高血糖状態の結果として、タンパクが還元糖と結合して糖化反応が起こり、活性酸素、 H_2O_2 や $\cdot OH$ が増加し、これらの酸化ストレスに対する防御機構として重要なSODは、この反応の過程で生じた活性酸素のうち最初に生成される $O_2^{\cdot -}$ を消去する酵素であるが、糖化によって活性低下やDNAの断片化などを生じる¹⁸⁾ことがわかっている。肝組織のSOD活性は対照群(W-CRL)に比べて糖尿病ラット(W-STZ)とFFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)で上昇傾向であった。腎組織のSOD活性も肝組織と同様に対照群(W-CRL)に比べて糖尿病ラット(W-STZ)およびFFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)で上昇し、肝および腎組織のいずれも群間に有意差が明確に認められなかったことについては不明である。

以上の結果より、FFBBEを添加したことで血清のTG、血清TBARS、肝および腎組織のTBARSが顕著に低下したことから脂質過酸化の抑制に極めて有効であると思われる。江崎ら⁴⁻⁹⁾は、*Aspergillus saitoi*で発酵させた大豆中に強い抗酸化活性をもつイソフラボン類縁体を、また*Aspergillus oryzae*で発酵させた大豆麹にも強い抗酸化活性物質を見出し、脂質の酸化抑制効果に関する有効性を得ている。今回、本実験に用いた米胚芽・大豆を原料とした生豆・糖類発酵抽出物(FFBBE)は、*Bacillus subtilis natto*で発酵・抽出して得られた試料であることから、この発酵過程において抗酸化活性物質の生成する可能性があることが推測される。そしてこれらの有効成分が酸化ストレスで発生した細胞内の活性酸素の消去または脂質の過酸化抑制ならびに糖尿病予防に貢献可能な食品素材であると考察した。

要 約

6週齢のWistar系雄ラットを対照群(W-CRL)、STZ誘発糖尿病ラット(W-STZ)、FFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)の3群に分け、4週間飼育した。

体重増加は対照群(W-CRL)より低値であったが、糖尿病ラット(W-STZ)に比べてFFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)の生育が良好であった。FFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)の血清T-cholおよびTGは、糖尿病ラット(W-STZ)より有意に低値となり、T-cholは対照群(W-CRL)のレベルまで低下した。肝および腎組織のTBARSは、糖尿病ラット(W-STZ)に比べてFFBBE添加糖尿病ラット(W-STZ-FFBBE)が有意に減少し、脂質過酸化物の抑制効果が顕著に認められた。尿中8-OHdGは糖尿病ラット(W-STZ)で最も高く、

FFBBE添加糖尿病ラット (W-STZ-FFBBE) で低下の傾向を示した。抗酸化に關与する酵素系活性についてみると、GST活性は、肝組織よりも腎組織において対照群 (W-STZ) に比べて糖尿病ラット (W-STZ) およびFFBBE添加糖尿病ラット (W-STZ-FFBBE) で有意に高値を示した。SOD活性は3群間に有意差を認めなかった。今回用いたコーヒー生豆・大豆および米糠混合醗酵抽出物は、脂質過酸化抑制に有効であると考えられる。

文 献

- 1) Buccala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A and Vlassara H : Lipid advanced glycosylation : Pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci* , **90** , 6434 - 6438 (1993)
- 2) Kirshtein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D and Vlassara H : Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor : Role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci* , **87** , 9010 - 9014 (1990)
- 3) Osawa T : Protective role of rice polyphenols in oxidative stress. *Anticancer Research* , **19** , 3645 - 3650 (1999)
- 4) Esaki H, Onozaki H and Osawa T : Food phytochemicals for cancer prevention . p . 353 - 360 . American chemical society. (1994)
- 5) Esaki H, Onozaki H, Kawakishi S and Osawa T : New antioxidant isolated from tempeh. *J Agric Food Chem* , **44** , 696 - 700 (1996)
- 6) Esaki H, Onozaki H, Kawakishi S and Osawa T : Antioxidant activity and isolation from soybean fermented with *Aspergillus spp.* *Agric Food Chem* , **45** , 2020 - 2024 (1997)
- 7) Esaki H, Onozaki H, Morimatsu Y, Kawakishi S and Osawa T : Potent antioxidant isoflavones isolated from soybean fermented with *Aspergillus saitoi*. *Biosci Biothechnol Biochem* , **62** , 740 - 746 (1998)
- 8) Esaki H, Watanabe R, Onozaki H, Kawakishi S and Osawa T : Formation mechanism for potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. *Biosci Biothechnol Biochem* , **63** , 851 - 858 (1999)
- 9) Esaki H, Kawakishi S, Morimatsu Y and Osawa T : New potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in fermented japanese soybean products. *Biosci Biothechnol Biochem* , **63** , 1637 - 1639 (1999)
- 10) 内藤周幸, 山中 健 : 動脈硬化性疾患と過酸化脂質 . 日本老年医学会誌 , **15** , p.187 - 191 (1978)
- 11) 村松正実編 : 新化学実験講座5 : 生体酸化・薬物代謝 , p.340 - 341 . 東京化学同人 . 東京 (1992)
- 12) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* , **249** , 7130 - 7139 (1974)
- 13) Beutler E : Red Cell Metabolism Grune Stratton 3rd ed p.74 (1984)
- 14) McCord JM and Fridovich I : Superoxide dismutase An enzyme function for erythrocyte (hemocytin). *J Biol Chem* , **4** , 6049 - 6055 (1969)
- 15) 小竹英俊, 及川真一 : 糖尿病における高脂血症診療 : 臨床成人病 , **29** , 1215 - 1221 (1999)
- 16) Mak DHF, Ip S P, Li P C, Poon M K T and Ko K M : (1996) Alteration in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* , **162** , 153 - 158 (1996)
- 17) Kakkar K, Kalra J, Mantha SV and Prasad K : Lipid peroxidation antioxidant enzyme in diabetic rats . *Mol Cell Biochem* , **151** , 113 - 119 (1995)
- 18) Berlett B S and Stadtman E R : Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* , **272** , 20313 - 20316 (1997)